

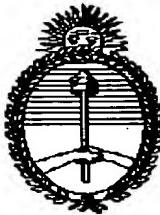
COPIA OFICIAL
CONVENIO DE PARIS
Lisboa 1958.

09/830964

05/99/26241

REPUBLICA

ARGENTINA



4

05/99/26241

PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

*Ministerio de Economía
y Obras y Servicios Públicos
Instituto Nacional de la Propiedad Industrial*

CERTIFICADO DE DEPOSITO

Acta N° P98 01 05610

REC'D 25 JAN 2000

WIPO PCT

El Comisario de la Administración Nacional de Patentes, certifica que con fecha 6 de NOVIEMBRE de 19 98 se presentó a nombre de BIO SIDUS S.A., CON DOMICILIO EN CAPITAL FEDERAL.

una solicitud de Patente de Invención relativa a "PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE A PARTIR DE SOBRENADANTES DE CULTIVO".

cuya descripción y dibujos adjuntos son copia fiel de la documentación depositada en el Instituto Nacional de la Propiedad Industrial.

Se certifica que lo anexado a continuación en dieciocho fojas es copia fiel de los registros de la Administración Nacional de Patentes de la República Argentina de los documentos de la solicitud de Patentes de Invención precedentemente identificada.

A PEDIDO DEL SOLICITANTE Y DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO EN LA CONVENCION DE PARIS (LISBOA 1958), APROBADO POR LEY 17.011, EXPIDO LA PRESENTE CONSTANCIA DE DEPOSITO EN BUENOS AIRES, REPUBLICA ARGENTINA, a los veinticuatro días del mes de JUNIO de 1999.

Ing. GERARDO P. BELLOTTI
Comisario
Adm. Nacional de Patentes



Memoria Descriptiva de la Patente de Invención

Sobre

Procedimiento para la purificación de Eritropoyetina Humana Recombinante a partir de sobrenadantes de cultivo.

Solicitada por
Bio Sidus S.A.

Por el plazo de 20 años



Constitución 4234 - 1254
Buenos Aires - Argentina



**LA PRESENTE PATENTE DE INVENCION TIENE POR OBJETO PRINCIPAL UN
PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION DE ERITROPOYETINA HUMANA
RECOMBINANTE A PARTIR DE SOBRENADANTES DE CULTIVO DE CELULAS**

A pesar que existe gran cantidad de información referida a la producción de Eritropoyetina recombinante humana (EPO), no se ha descripto ningún método que lleve a la purificación de EPO apta para su utilización en humanos, con una pureza mayor al 99 % y con ausencia de contaminantes como: a) material agregado, b) degradados, c) proteínas espúreas y, d) proteasas. Una pureza menor del 99 % o la presencia de cualquiera de los contaminantes mencionados puede ser tóxico para el ser humano.

La mayor parte de los sistemas conocidos llevan a obtener material de calidad suficiente, en el mejor de los casos, para uso *in vitro*, pero no para inyección en humanos.

Adicionalmente, muchos de los métodos publicados son imposibles de reproducir, o de utilizar a escala industrial, o tienen bajísima recuperación o todo ello al mismo tiempo.

Novedad del invento - objeto principal de la patente

El novedoso método de la invención describe en detalle un sistema de purificación de EPO con el que se logra una alta recuperación, con gran pureza y calidad del producto obtenido, en modo que éste puede ser utilizado sin posteriores tratamientos de purificación, para formular compuestos farmacéuticos de uso en medicina humana, por ejemplo como inyectables.

El procedimiento de purificación reivindicado en la presente patente de invención, incluye una serie de pasos concatenados (micro y ultrafiltraciones, cromatografías líquidas, precipitaciones, etc.), y que deben rendir una molécula con un alto grado de pureza. Esta



molécula debe estar libre de proteasas y de variantes moleculares no deseadas (agregados, degradados, moléculas de punto isoeléctrico diferentes del esperado, etc.).

La invención reivindicada describe un procedimiento para la purificación a escala industrial de EPO apta para uso en humanos.

El procedimiento para la purificación de Eritropoyetina humana recombinante se realiza a partir de sobrenadantes de cultivo de células, y se destaca porque no se utilizan pasos de HPLC.

La EPO obtenida mediante el procedimiento reivindicado tiene más del 99 % de pureza.

El procedimiento se destaca además porque no somete a la EPO a condiciones extremas de temperatura o exposición a solventes orgánicos o inorgánicos que pueden resultar agresivos para la proteína.

El procedimiento conlleva pasos de purificación que incluyen precipitaciones diferenciales, interacción hidrofóbica, intercambio aniónico, intercambio catiónico y exclusión molecular.

La EPO que se obtiene siguiendo el procedimiento de la presente patente de invención puede ser utilizada directamente en formulaciones farmacéuticas para su uso en humanos. La EPO obtenida es una proteína heterogénea conformada por no menos de 5 y no más de 8 isoformas de punto isoeléctrico comprendido entre 3,0 y 4,5 y que posee una actividad biológica medida *in vivo* de no menos de 100.000 Unidades Internacionales/mg de proteína.



El procedimiento lleva a obtener EPO libre de material degradado y/o agregados, así como de proteasas.

EJEMPLO 1.

Etapa 1. Recuperación (Clarificación)

En 30 litros de concentrado estéril proveniente de sobrenadantes de cultivo de células productoras de EPO se disuelven 7920 gramos de Sulfato de Amonio y la solución se mantiene a 4 °C durante 24 h. Varias proteínas contaminantes precipitan mientras la EPO permanece en solución. El producto es centrifugado a 5000 RPM, en una centrífuga marca Sorvall, utilizando un rotor HG4L.

Etapa 2. Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

El material proveniente del paso anterior es cromatografiado utilizando una matriz de Interacción Hidrofóbica (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow low sub.- Pharmacia) de acuerdo a:

Equipamiento

Pre-Columna:

- Diámetro: 10 cm
- Altura de Lecho: 25 cm
- Matriz:
 - Q-Sepharose Big Bead. (Pharmacia)
 - Volumen : 2000 ml

Columna:

- Diámetro: 20 cm



-Altura de Lecho: 13 cm

-Matriz:

-Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow low sub. (Pharmacia)

-Volumen: 4000 ml

Soluciones y buffers

-Buffer A: NaH_2PO_4 anh. 10 mM, pH 7.2

-Buffer F: NaH_2PO_4 anh. 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.8 M, pH 7.2

-Buffer G: NaH_2PO_4 anh. 150 mM, pH 7.2

-Isopropanol 30 %

-NaOH 0.5 N

Material a Cromatografiar

Material: Sobrenadante de Sulfato de Amonio, proveniente del ejemplo 1.

Condiciones de la Muestra :

-Volumen: 10.000 ml

-Masa proteica total (Bradford): 20-40 gramos

-Concentración aproximada (Bradford): 2.0-4.0 mg/ml

-Conductividad: 190-210 mSi/cm

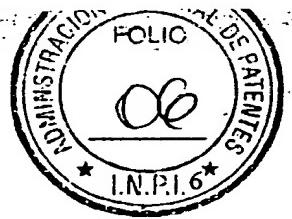
-pH: 7.2

Sanitización y Equilibrado de la precolumna (*)

Para equilibrar la precolumna se procede a pasar por la misma, en forma secuencial las siguientes soluciones o buffers en las cantidades que se detallan a continuación: 1.0 vc (2 litros) de Agua; 1.0 vc (2 litros) de NaOH 0.5N ; 1.0 vc (2 litros) de Buffer G y finalmente 1.5 vc (3 litros) de Buffer F,

Sanitización y Equilibrado de la columna (*)

Para equilibrar la columna se procede a pasar por la misma, en forma secuencial las siguientes



soluciones o buffers en las cantidades que se detallan a continuación: 1.0 vc (4 litros) de *Agua*; 1.0 vc (4 litros) de *Isopropanol 30%*; 1.0 vc (4 litros) de *Agua*, 1.0 vc (4 litros) de *NaOH 0.5N*; 1.0 vc (4 litros) de *Agua*; 1.0 vc (4 litros) de *Buffer G* y finalmente 1.5 vc (6 litros) de *Buffer F*

Condiciones de corrida

Una vez equilibradas la precolumna y la columna, se conectan la segunda a continuación de la primera y se procede a sembrar el material a cromatografiar. Dicha siembra se realiza a una temperatura de 4 °C con un flujo de 100 ml/min (24 cm/hora). A continuación se realiza la elución al mismo flujo pero a temperatura ambiente, haciendo pasar las siguientes soluciones y buffers en el orden y cantidades detallados a continuación: 2.5 vc (10 litros) de *Buffer F*, (pasado este buffer se retira la precolumna). Una vez retirada la precolumna la corrida cromatográfica se sigue realizando sobre la columna de Phenyl Sepharose sobre la cual se realiza un gradiente de *Buffer F-Buffer A* partiendo de una proporción 85:15 de dichos buffer hasta llegar a una relación 50:50 de los mismos en un volumen total de 10 vc (40 litros). Terminado el gradiente se pasan 1.5 vc (6 litros) de *Buffer F-Buffer A* en una proporción 30:70 y finalmente 1.5 vc (6 litros) de *Agua*

Las fracciones seleccionadas, conteniendo eritropoyetina son esterilizadas por filtración a través de una membrana con poros de 0,22 µm y se conservan a 4 °C.

(*) vc significa volumen de columna

Etapa 3. Concentración y Diafiltración

Las fracciones provenientes de la etapa 2 son concentradas y diafiltradas de acuerdo a las condiciones que se detallan a continuación.

Equipamiento

Bomba peristáltica : Watson Marlow - Cat. N° 302S

Tubuladura : Masterflex - Cat. N° 06402-18



Concentrador : Prep Scale Millipore CDU F006LC

Soluciones y buffers

- Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10 mM
- Tritón X-100 1mM
- NaOH 0.1N
- Agua
- Buffer A : NaH₂PO₄, anh. 10 mM, pH 7.2

Material a Procesar

Material : Fracciones seleccionadas provenientes de la etapa 2.

Condiciones de la Muestra :

Volumen: 7000-10000 ml

Conductividad: 170-130 mSi/cm

pH: 7.2

Procedimiento

En primer lugar se procede a la limpieza, sanitización y equilibración del equipo haciendo pasar por el mismo la siguiente secuencia de soluciones y buffers: 10 litros de SDS 10 mM; 40 litros de Agua; 10 litros de Tritón X-100 1 mM, 40 litros de Agua; 10 litros de NaOH 0.1N; 40 litros de Agua y finalmente 5 litros de Buffer A. De esta forma el equipo queda en condiciones de ser utilizado para realizar el proceso de concentración y diafiltración contra Buffer A de las fracciones seleccionadas, de acuerdo a la metodología corriente.

Condición final de concentración

Volumen final de concentrado: 2.000 ml

Diafiltrado contra: Buffer A.

Conductividad: 1100-1550 µSi/cm

pH: 7.2



Etapa 4. Cromatografía de intercambio aniónico.

El material proveniente del paso anterior es cromatografiado utilizando una matriz de Intercambio aniónico de acuerdo a:

Equipamiento

Columna:

- Diámetro: 10 cm
- Altura de Lecho: 25 cm
- Matriz
 - Q-Sepharose Fast Flow. (Pharmacia)
- Volumen: 2000 ml

Soluciones y buffers

- Buffer A: NaH₂PO₄ anh. 10 mM, pH 7.2
- Buffer G: NaH₂PO₄ anh. 150 mM, pH 7.2
- Buffer N: Ac. Acético 50 mM, ClNa 500 mM, pH 4.0
- Buffer S: Ac. Acético 50 mM, pH 4.0
- NaOH 0.5 N

Material a Cromatografiar

Material: Fracciones seleccionadas de Interacción Hidrofóbica, concentradas y diafiltradas.

Condiciones de la Muestra:

- Volumen: 2.000 ml
- Masa proteica total (Bradford): 8.0-10 gramos
- Concentración aproximada (Bradford): 4.0-5.0 mg/ml
- Conductividad: 1100-1550 μ Si/cm
- pH : 7.2



Sanitización y Equilibrado de la columna (*)

Para equilibrar la columna se procede a pasar por la misma, en forma secuencial las siguientes soluciones o buffers en las cantidades que se detallan a continuación: 1.0 vc (2 litros) de *Aqua*; 1.0 vc (2 litros) de *NaOH 0.5N*; 1.0 vc (2 litros) de *buffer N*; 2.0 vc (4 litros) de *Buffer S*; 3.0 vc (6 litros) de *Buffer G*; y finalmente 2.0 vc (4 litros) de *Buffer A*

Condiciones de corrida (*)

Una vez equilibrada la columna se procede a sembrar el material a cromatografiar. Dicha siembra se realiza a temperatura ambiente a un flujo de 100 ml/min (76 cm/hora). A continuación se realiza la elución al mismo flujo y temperatura, haciendo pasar las siguientes soluciones y buffers en el orden y cantidades detallados a continuación: 1.0 vc (2 litros) de *Buffer A* y 4.0 vc (8 litros) de *Buffer S*. A continuación se realiza un gradiente de *Buffer S*-*Buffer N* partiendo de una proporción 100:0 de dichos buffer hasta llegar a una relación 50:50 de los mismos en un volumen total de 1.5 vc (3 litros). Terminado el gradiente se pasan 1.5 vc (3 litros) de *Buffer N*. Las fracciones seleccionadas, conteniendo eritropoyetina son esterilizadas por filtración a través de una membrana con poros de 0,22 µm y se conservan a 4 °C.

(*) vc significa volumen de columna

Etapa 5. Cromatografía de intercambio catiónico.

El material proveniente de la etapa 4 es cromatografiado utilizando una matriz de Intercambio catiónico de acuerdo a:

Equipamiento

Columna:

-Diámetro: 10 cm

-Altura de Lecho: 25 cm

-Matriz:



-SP-Sepharose Fast Flow. (Pharmacia)

-Volumen : 2000 ml

Soluciones y buffers

-Buffer D: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 12.5 mM, Ac. Cítrico. H_2O 4 mM, pH 6.0

-Buffer E: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 12.5 mM, Ac. Cítrico. H_2O 4 mM, ClNa 0.5M , pH 6.0

-NaOH 0.5 N

Material a Cromatografiar

Material: Fracción seleccionada en la etapa 4 ajustada a pH 6.0 con NaOH cc. y diluida hasta conductividad 4800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (conductividad igual a Buffer D-Buffer E 93.5:6.5)

Condiciones de la Muestra:

-Volumen: 5.000 ml

-Masa proteica total (Bradford): 4.5-5.5 gramos

-Concentración aproximada (Bradford): 0.9-1.1 mg/ml

-Conductividad : 4800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Igual a Buffer D-Buffer E en un aproporción 93.5:6.5)

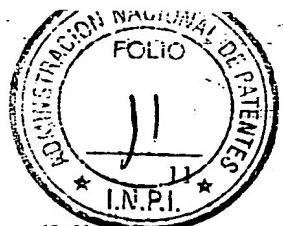
-pH: 6.0

Sanitización y Equilibrado de la columna (*)

Para equilibrar la columna se procede a pasar por la misma, en forma secuencial las siguientes soluciones o buffers en las cantidades que se detallan a continuación: 1.0 vc (2 litros) de Agua; 1.0 vc (2 litros) de $\text{NaOH} 0.5\text{N}$; 1.0 vc (2 litros) de BufferE y finalmente 1.5 vc (3 litros) de Buffer D-Buffer E en una proporción 93.5:6.5

Condiciones de corrida (*)

Una vez equilibrada la columna se procede a sembrar el material a cromatografiar. Dicha siembra se realiza a temperatura ambiente a un flujo de 100 ml/min (76 cm/hora). A continuación se realiza la elución al mismo flujo y temperatura, haciendo pasar las siguientes



soluciones y buffers en el orden y cantidades detallados a continuación: 1.5 vc (3 litros) de *Buffer D-Buffer E* en un aproporción 93.5:6.5. A continuación se realiza un gradiente de *Buffer D-Buffer E* partiendo de una proporción 93.5:6.5 de dichos buffer hasta llegar a una relación 50:50 de los mismos en un volumen total de 2.0 vc (4 litros). Terminado el gradiente se pasan 1.5 vc (3 litros) de *Buffer E*. Las fracciones seleccionadas, conteniendo eritropoyetina son esterilizadas por filtración a través de una membrana con poros de 0,22 μm y se conservan a 4 °C.

(*) vc significa volumen de columna

Etapa 6. Concentración y Diafiltración

Las fracciones provenientes del paso anterior son concentradas y diafiltradas de acuerdo al procedimiento que sigue.

Equipamiento

Bomba peristáltica: Watson Marlow - Cat. N° 302S

Tubuladura: Masterflex - Cat. N° 06402-18

Concentrador: Prep Scale Millipore CDU F002LC

Soluciones y buffers

-Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10 mM

-Tritón X-100 1mM

-NaOH 0.1N

-Agua

-Buffer B : NaH_2PO_4 anh. 10 mM, ClNa 0.5 M, Lactosa 0.05 mg/ml, pH 7.2

Material a Procesar

Material: Fracciones seleccionadas en la etapa 5.

Condiciones de la Muestra:



- Volumen: 8000 ml
- Masa proteica total (Bradford): 3.5-4.5 gramos
- Concentración aproximada (Bradford): 0.4-0.6 mg/ml
- Conductividad: 5000-8000 μ Si/cm
- pH: 6.0

Procedimiento

En primer lugar se procede a la limpieza, sanitización y equilibración del equipo haciendo pasar por el mismo la siguiente secuencia de soluciones y buffers: 10 litros de SDS 10 mM; 40 litros de Agua; 10 litros de Tritón X-100 1 mM, 40 litros de Agua; 10 litros de NaOH 0.1N; 40 litros de Agua y finalmente 5 litros de Buffer B. De esta forma el equipo queda en condiciones de ser utilizado para realizar el proceso de concentración y diafiltración contra Buffer B de las fracciones seleccionadas, de acuerdo a la metodología corriente.

Condición final de concentración

Volumen final de concentrado: 400 ml

Diafiltrado contra: Buffer B.

Conductividad: 15500-19000 μ Si/cm

pH: 7.2

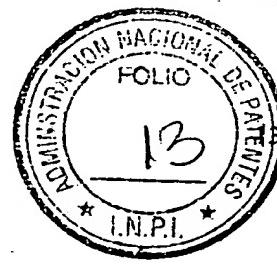
Conservación: a 4°C.

Etapa 7. Cromatografía de exclusión molecular

El material proveniente del paso anterior es cromatografiado utilizando una matriz de exclusión molecular de acuerdo a:

Equipamiento

Columna:



-Diámetro: 10 cm

-Altura de Lecho: 76 cm

Matriz:

-Sephacryl S-200 HP (Pharmacia)

-Volumen: 6000 ml

Soluciones y buffers

-Buffer B: NaH_2PO_4 anh. 10 mM, ClNa 0.15 M, Lactosa 0.05 mg/ml, pH 7.2

- NaOH 0.5 N

Material a Cromatografiar

Material: Fracciones seleccionadas en la etapa 6 concentradas.

Condiciones de la Muestra:

-Volumen: 400 ml

-Masa proteica total (Bradford): 3.5-4.5 gramos

-Concentración aproximada (Bradford): 8.5-11 mg/ml

-Conductividad: 15500-19000 $\mu\text{Si}/\text{cm}$

-pH: 7.2

Sanitización y Equilibrado de la columna (*)

Para equilibrar la columna se procede a pasar por la misma, en forma secuencial las siguientes soluciones o buffers en las cantidades que se detallan a continuación: 1.0 vc (6 litros) de *Agua*; 1.5 vc (9 litros) de *NaOH 0.5N* y finalmente 3.0 vc (18 litros) de *Buffer B*.

Condiciones de corrida (*)

Una vez equilibrada la columna se procede a sembrar 100 ml del material a cromatografiar.

Dicha siembra se realiza a temperatura ambiente a un flujo de 35 ml/min (27 cm/hora). A continuación se realiza la elución al mismo flujo y temperatura, haciendo pasar 0.75 vc (4.5



litros) de *Buffer B*. Este procedimiento se repite 4 veces, es decir, hasta finalizar el material a cromatografiar. Las fracciones seleccionadas, conteniendo eritropoyetina son esterilizadas por filtración a través de una membrana con poros de 0,22 μm y se conservan a 4 °C.

(*) vc significa volumen de columna

nifica volumen de columna.

En este paso concluye el proceso de purificación obteniéndose eritropoyetina humana recombinante con un grado de pureza superior al 99 % y con rendimiento global del proceso aproximado al 30 %.

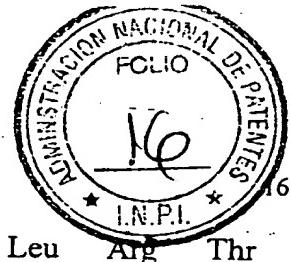
La EPO obtenida en el presente ejemplo fue sometida a diferentes estudios identificatorios y que prueban su calidad.

1. En un gel desnaturalizante SDS-PAGE corrió como una banda ancha de más de 30 kDa de peso molecular.
2. Esa banda fue reconocida por un anticuerpo monoclonal así como por un anticuerpo policlonal contra Epo humana en un ensayo "Western blot".
3. El tratamiento con glicanasas probó la existencia de las cadenas glicosídicas en cantidad y peso molecular acorde a lo esperado.
4. La EPO producida mostró estar compuesta por una serie de especies de punto isoeléctrico comprendido entre 3,0 y 4,5
5. La secuenciación completa de aminoácidos de la proteína aislada y purificada a



partir del sobrenadante de cultivo de las líneas celulares transfectadas mostró una homología con la eritropoyetina humana natural que posee la siguiente secuencia de 165 aminoácidos.

NH ₂ -	Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu
Glu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	<u>Asn</u>	
Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	Hys	Cys	Ser	Leu	Asn	
Glu	<u>Asn</u>	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe	
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	
Val	Glu	Val	Trp	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	
Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu	Leu	Val	<u>Asn</u>	Ser	
Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	Hys	Val	Asp	
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	
Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	



Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	<u>Ser</u>	Ala	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr
Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr
Thr	Gly	Glu	Ala	Cys	Arg	Thr	Gly	Asp-COOH			

X sitios de glicosilación

6. La presencia de los cuatro sitios de glicosilación sobre la cadena de 165 aminoácidos así como la estructura compleja de hidratos de carbono, fundamentalmente los residuos de ácido siálico terminales, fueron demostrados conjuntamente con su correcta actividad biológica *in vivo*, en el modelo de ensayo del ratón policitómico ex-hipóxico, exhibiendo total paralelismo frente al estándar internacional correspondiente.



REIVINDICACIONES

Habiendo descripto y exemplificado la naturaleza y objeto principal de la presente invención, así como también la manera en que la misma se puede llevar a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y de derechos exclusivos:

1.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACIÓN DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE A PARTIR DE SOBRENADANTES DE CULTIVO DE CÉLULAS caracterizado por incluir la siguiente sucesión de etapas:

- 1.- Realizar una recuperación de EPO mediante una precipitación diferencial.
- 2.- Realizar una cromatografía por interacción hidrofóbica.
- 3.- Acondicionar el material mediante concentración y diafiltración.
- 4.- Realizar una cromatografía por intercambio aniónico.
- 5.- Realizar una cromatografía por intercambio catiónico.
- 6.- Acondicionar el material mediante concentración y diafiltración.
- 7.- Realizar una cromatografía de exclusión molecular.

ERITROPOYETINA obtenida por el procedimiento indicado en la reivindicación 2, es decir, ERITROPOYETINA obtenida por el procedimiento indicado en la reivindicación 1, se caracteriza

porque la EPO obtenida tiene más del 99% de pureza.

BIO SIDUS S.A.
HUMBERTO M. DE PASQUALE
APODERADO



RESUMEN

La presente invención se refiere a un método altamente eficiente, caracterizado por su reproducibilidad, alto rendimiento y susceptibilidad de aplicación industrial para la obtención de EPO.

El procedimiento incluye una secuencia específicamente diseñada que incluye precipitación diferencial, cromatografía líquida de interacción hidrofóbica, intercambio aniónico, intercambio catiónico y de exclusión molecular.

Se brinda información analítica que avala la calidad de la EPO obtenida.

La EPO de altísima pureza queda finalmente en un buffer de composición definida, lo que permite su posterior formulación farmacéutica.

